FR

Legionella Urine Antigen EIA

Test immunoenzymatique pour la détection *in vitro* de l'antigène de *Legionella* dans les urines.

Conditionnement

REF [3] 807 600 96 tests IVD coffret de tests complets

Usage prévu

La maladie des légionnaires est provoquée par *Legionella pneumophila* et il s'agit d'une maladie respiratoire aiguë. Elle peut prendre la forme d'une maladie grippale d'intensité moyenne (dite fièvre de Pontiac) ou peut provoquer une pneumonie qui, si elle n'est pas traitée, peut présenter un taux de létalité relativement élevé (1). Le taux de mortalité, qui dans le cas de sujets immunocompétents peut atteindre 20% en l'absence d'un traitement adéquat, peut être réduit si l'on met en place un traitement antimicrobien approprié dès le stade précoce grâce à un diagnostic rapide. Si l'on considère les infections chez l'homme, l'espèce *Legionella pneumophila* est celle détectée le plus fréquemment (80-85%) et plus rarement 18 autres espèces de *Legionella* sont susceptibles d'entraîner une pneumonie. Les souches d'espèces de *Legionella* isolées de patients appartiennent surtout au sérogroupe 1, mais il existe 14 autres sérogroupes (2).

Depuis 1979, la détection d'un antigène spécifique dans l'urine a, en diverses occasions, été décrite comme un test simple et fiable (3,4), mais, jusqu'à présent, cette technique se limite à la détection du sérogroupe 1. Le test présenté ici détecte l'antigène spécifique de *Legionella* et reconnaît tous les sérogroupes de *L. pneumophila* avec un spectre de réactivité croisée relativement large ainsi que d'autres espèces de *Legionella* (5).

Principe de la méthode

Les barrettes d'une microplaque sont tapissées par des anticorps monoclonaux de lapins qui réagissent avec l'antigène de *Legionella pneumophila* de tous les sérogroupes ainsi que d'autres espèces de *Legionella*. L'urine du patient est ajoutée dans les puits de la microplaque et tout antigène de *Legionella* présent se liera à l'anticorps spécifique sur la phase solide. Après la première incubation, les puits sont lavés et un anticorps marqué par une peroxydase qui réagit avec l'antigène de *Legionella pneumophila* est ajouté ; il se lie aux sites de liaison libres de l'antigène pendant une seconde incubation. Après une autre étape de lavage, la présence de peroxydase liée est mise en évidence dans une réaction colorée avec un substrat. La réaction est stoppée par addition d'acide sulfurique et la densité optique (DO) est mesurée avec un spectrophotomètre à 450 nm et à une longueur d'onde de référence de 615-690 nm.

La trousse contient

MTP	1	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés par une IgG anti-*Legionella* de lapin (concentration: > 0,5 µg/ml) incluant un cadre de MTP .
NC	2 x 1,5 ml	**Etalon/Contrôle négatif** Urine humaine, négative pour l'antigène de *Legionella* (prêt à l'emploi, humain, autoclavé) Conservateur : 0,095% d'azoture de sodium
PC	1,5 ml	**Contrôle positif** Antigène de *Legionella pneumophila* (prêt à l'emploi) Conservateur : 0,095% d'azoture de sodium (surnageant de culture)
CONJ	15 ml	**Anticorps anti-*Legionella* de lapin** marqués par de la peroxydase de raifort (HRP) dans un tampon Tris avec stabilisateur de protéine Conservateur : 0,05% de Proclin-300®
WB	6 ml	**Tampon de lavage concentré** (500 x) Tampon phosphate 0,08 M, pH 7,2 conservateur: 0,01 % de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol
SUB	2 x 11 ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB) < 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	15 ml	**Solution d'arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	**Sachet de conservation :** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées avec déshydrazat.
	1	**Notice du coffret**

Conservateurs: concentration totale < 0,2%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques (avec lavage de fond) et incubateur à 37°C pour les MTP.

Avertissement et précautions

Ne pas ingérer les réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter tous les échantillons d'urine, les contrôles et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les urines contrôles ont été passées à l'autoclave et filtrées de façon stérile, mais elles doivent néanmoins être traitées comme potentiellement infectieuses. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement les MTP utilisées et toutes les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiquement contrôlées. En cas de trousse d'origine détériorée, en informer le fabricant.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2-8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2-8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées dans le sachet de conservati avec le déshydrazat et les conserver ainsi à 2-8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

W1: laver 5 fois avec le tampon de lavage. Pour cela, éliminer le liquide du puits et distribuer 300 µl de tampon de lavage. Remplir le puits avec au moins 250 µl de tampon de lavage (volume total 550 µl). Répéter cette procédure de lavage 5 fois. Effectuer les étapes suivantes immédiatement après. Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Préparation des réactifs

Diluer le tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (1:501, par exemple 1 ml plus 500 ml). Le tampon de la lavage ainsi préparé est stable pendant 2 semaine, conservé à 2-8°C. En cas de cristallisation après stockage entre 2 et 8°C, remettre le tampon de lavage concentré en solution en le portant à 37°C. Bien mélanger le tampon avant de le diluer. Tous les autres composants de la trousse du test sont prêts à l'emploi.

Préparation des échantillons

Les échantillons d'urine doivent être recueillis dans des conteneurs standards stériles, conservés à la température ambiante et testés dans les 24 heures. On peut aussi conserver les échantillons à 2-8°C pendant 14 jours ou les congeler à -20°C. Dans le cas d'échantillons d'urine contenant de grandes particules de matière, utiliser le surnageant limpide. Les échantillons d'urine congelés contenant de grandes concentrations de sels (phosphates, uréates), risquent de donner de plus grandes quantités de sels par précipitation lors de la décongélation. Après mélange et sédimentation, on peut utiliser le surnageant ou redissoudre les cristaux par chauffage à 37°C.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage).

Utiliser 100 µl de contrôle positif, de contrôle négatif et d'échantillon dans chaque puits. Les barrettes ne sont pas fermées par un film auto-adhésif.

Procédure de pipetage pour la détermination de la performance du test

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi.				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1	B1/ C1	D1	E1...
Blanc	--			
NC double test	--	100 NC	--	--
PC	--	--	100 PC	--
Echantillon	--	--	--	100
MTP				
Incubation: **60** ± 2 **mn**, 37 ±1°C	Processeur*: **60** ± 2 **mn**, 37 ±1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
MTP				
Incubation: **60** ± 2 **mn**, 37 ± 1°C	Processeur*: **60** ± 2 **mn**, 37 ±1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation: **10** ± 1 **mn** à la température ambiante dans l'obscurité	Processeur*: **10** ± 1 **mn** à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou **dans la minute** suivant l'arrêt, **à 450 nm**, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence : 615 - 690 nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

CE

BIO-RAD

Contrôle de qualité
Les contrôles positif et négatif doivent être inclus dans chaque série de tests pour évaluer les échantillons des patients et surveiller la performance du test. Des échantillons d'urine positifs ou négatifs connus peuvent être inclus, constituant des contrôles supplémentaires. La valeur moyenne des contrôles négatifs (après soustraction du blanc) doit être inférieure à 0,100. La valeur de DO du contrôle positif doit être supérieure à 0,600. La valeur de DO du blanc doit être inférieure à 0,150. Si ces conditions ne sont pas respectées, les résultats du test sont invalides et le test doit être recommencé.

Calcul de la valeur seuil
La DO du blanc est retranchée de toutes les valeures de DO des témoins et des prélèvements.
La valeur seuil est calculée à partir de la DO moyenne des contrôles négatifs (NCx) à laquelle on ajoute 0,200. Valeur seuil = (NCx) + 0,200.
Exemple: NCx = 0,023, seuil = 0,023 + 0,200 = 0,223
La zone grise est dans l'intervalle des DO suivant : DO ≥ DO moyenne de NC + 0,100 et DO < DO moyenne de NC + 0,200.
Exemple: NKx = 0,023, zone grise = 0,123 – 0,223.

Interprétation des résultats
Les échantillons d'urine ayant une valeur d'extinction inférieure au seuil sont considérés comme négatifs. **Remarque** : un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par *Legionella*. Les échantillons d'urine donnant une extinction égale ou supérieure au seuil sont considérés comme positifs pour la détection de l'antigène de *Legionella*. Les échantillons positifs peuvent être répétés pour confirmation. Les échantillons faiblement positifs, dans la région de + 0,200, doivent être répétés pour confirmation. Si l'échantillon est au-dessus du seuil après une nouvelle analyse, il doit être considéré comme positif. Les échantillons d'urine ayant une extinction dans la zone grise doivent être analysés à nouveau. Si la valeur de DO est à nouveau dans la zone grise, l'échantillon est alors considéré comme positif. Si la valeur de DO de l'échantillon est inférieure à la zone grise, l'échantillon est alors négatif.

Interprétation du diagnostic
Un résultat supérieur au seuil ou à plusieurs reprises dans la zone grise = résultat positif/présumé positif pour les antigènes de *Legionella* dans l'urine. Un tel résultat permet de suspecter une infection existante ou ancienne par *Legionella* (les échantillons faiblement positifs doivent être répétés pour confirmation, voir ci-dessus).
Un résultat < NCx + 0,200 = résultat négatif/présumé négatif pour les antigènes de *Legionella* dans l'urine. La possibilité d'une infection par *Legionella* ne peut pas être exclue, car la sensibilité du test n'est pas suffisante pour reconnaître absolument tous les cas de toutes les espèces de *Legionella*. La sécrétion d'antigènes peut être soumise à des variations. Il convient de tester d'autres échantillons au cours de la surveillance.

Limitations de la méthode
Ce test a été validé en utilisant des échantillons d'urine. D'autres matières (par exemple plasma, sérum ou fluides corporels) pouvant également contenir des antigènes de *Legionella* n'ont pas été testées. En dépit de sa large réactivité avec diverses espèces de *Legionella*, le test Legionella Urine Antigen EIA de Bio-Rad n'est pas capable de détecter les 39 espèces de *Legionella* avec une égale sensibilité (6,7). Le diagnostic de légionellose ne peut pas être établi sur la seule base des preuves cliniques ou radiologiques. La détection des antigènes, les résultats de culture et les tests sérologiques apportent d'autres aides au diagnostic, en association avec les observations cliniques.
La sécrétion des antigènes de *Legionella* dans l'urine peut varier, en fonction du patient, des maladies concomitantes et du traitement. De plus, la sécrétion peut varier chez un même patient dans le temps, ce qui nécessite le test d'une séquence de plusieurs échantillons d'urine. Un traitement antérieur par des antibiotiques appropriés peut réduire la sécrétion des antigènes chez certains patients. La sécrétion d'antigènes peut persister longtemps chez certains patients.
Quelles que soient la sensibilité et la spécificité du test, il faut noter que la détection positive d'antigènes dans l'urine doit être mise en corrélation avec les symptômes cliniques. La mise en relation de signes cliniques avec un test d'antigènes positif peut constituer un indicateur précoce.

Caractéristiques de performance
300 échantillons d'urine provenant de sujets sains et 176 échantillons d'urine provenant de sujets pour lesquels on suspecte une infection des voies urinaires ont été testés. 475 échantillons ont été négatifs dans le test urinaire des antigènes de *Legionella*. Un des sujets à suspicion d'infection des vois urinaires était faiblement positif (spécificité = 99,78%).

	Distribution des valeurs d'extinction des échantillons négatifs			
Absorption	0,001-0,099	0,100-0,199	0,200-0,299	Seuil
Nombre d'échantillons (total 476)	449	26	1	0,225

46 échantillons d'urine de patients pour lesquels la *Legionella* a été confirmée par culture ont été testés par le test Legionella Urine Antigen EIA Bio-Rad. Les 46 échantillons d'urine ont tous donné un résultat positif. Le tableau ci-dessous présente la distribution des valeurs d'absorption obtenues pour l'ensemble des 46 échantillons.

	Distribution des valeurs d'extinction d'échantillons positifs (culture positive)					
Absorption	0,001-0,199	0,200-0,499	0,500-0,999	1,000-1,999	>2,000	seuil
Nombre d'échantillons (total 46)	0	0	1	2	43	0,225

Spécificité du test Legionella Urine Antigen EIA: 99,8%
Sensibilité du test Legionella Urine Antigen EIA: 100,0%

Remarque : On escompte, pour la sensibilité absolue du test Legionella Urine Antigen EIA, chez les patients ayant une légionellose certaine une valeur de 50-70% (la publication du CDC (8) donne une valeur de 55,9% avec des tests comparables).
L'étude multicentrique européenne du "European Working Group on Legionella Infections" EWGLI (5) a donné une sensibilité de 94,6% pour le sérogroupe 1 de *Legionella pneumophila* et une sensibilité de 86% en incluant les échantillons des sérogroupes 2, 3, 4, 6, 10.

Littérature

1. Frazer, D.W. et coll. (1977). *N. Engl. J. Med*. 297, 1189-1197.
2. Robert Koch Institut (1996). Epidemiologisches Bulletin 35.
3. Edelstein, P.H. et coll. (1993). Legionnaires' disease – state-of-the-art clinical article. *Clin. Infect. Dis*. 16, 741-749.
4. Tang, P.W. et coll. (1986). Broad-Spectrum Enyzme-Llinked Immunosorbent Assay for Detection of Legionella Soluble Antigens. *J. Clin. Microbiol*. 24, 556-558.
5. Harrison, T. et coll. (1998). A multicenter evaluation of the Biotest Legionella urinary antigen EIA. *Clin. Microbiol. Infect*. 4, 359-365.
6. Okada, C. et coll. (2002). Cross-Reactivity and Sensitivity of Two Legionella Urinary Antigen Kits, Biotest EIA and Binax NOW, to Extracted Antigens from Various Serogroups of L. pneumophila and Other Legionella Species. *Microbiol. Immunol*. 46, 51-54.
7. Horn, J. et coll. (2002). Comparison of non-serogroup 1 detection by Biotest and Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassays. In: Marre, R. et coll. (eds.). Legionella, ASM Press, 207-210.
8. Plouffe, J.F. et coll. (1995). *Clin. Infect. Dis.* 20, 1286-1291.
9. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices.

Guide de dépannage
1) Valeur de NC supérieure au critère de validité, DO > 0,100 :
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage : Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Utiliser le WB de Bio-Rad contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde : une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
2) Coloration jaune dans tous les puits :
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage
   b) CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
3) Valeur de DO moyenne de PC inférieure à < 0,600 :
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage : lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC ou 2b.

Clé : Souligner = Addition ou modification significative ◄= Effacement du texte

Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany
Tel.: +49-6103-801-95, Fax: +49-6103-801-724
www.bio-rad.com, techsupport.bmd@bio-rad.com

BIO-RAD

CE

187774/11 – 08/2010